

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année Scolaire 1929-1930 N° 122

Travail de Laboratoire de l'Institut Bactériologique de Lyon

Recherches sur le critérium bactériologique
de contamination des eaux potables

THÈSE

PRÉSENTÉE

à la FACULTÉ de MÉDECINE et de PHARMACIE de LYON

et soutenue publiquement le 28 Juin 1930

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Andrée URTINETTE

Licenciée ès sciences

Diplômée d'hygiène et de microbiologie de l'Université de Lyon

Préparateur à l'Institut Bactériologique

Née le 10 Octobre 1902, à TOURCOING (Nord)



LYON

Imprimerie BOSC Frères & RIOU

42, Quai Gailleton, 42

1930

**RECHERCHES sur le CRITERIUM BACTÉRIOLOGIQUE
de CONTAMINATION des EAUX POTABLES**

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année Scolaire 1929-1930 N° 122

Travail de Laboratoire de l'Institut Bactériologique de Lyon

Recherches sur le critérium bactériologique
de contamination des eaux potables

THÈSE

PRÉSENTÉE

à la FACULTÉ de MÉDECINE et de PHARMACIE de LYON

et soutenue publiquement le 28 Juin 1930

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Andrée URTINETTE

Licenciée ès sciences

Diplômée d'hygiène et de microbiologie de l'Université de Lyon

Préparateur à l'Institut Bactériologique

Née le 10 Octobre 1902, à TOURCOING (Nord)



LYON

Imprimerie BOSC Frères & RIOU

42, Quai Gailleton, 42

1930

PERSONNEL DE LA FACULTÉ



Doyen honoraire M. L. HUGOUNENQ.
 Doyen M. J. LEPINE.
 Assesseur M. ROLLET.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. AUGAGNEUR, CAZENEUVE, ROQUE, LANNOIS

PROFESSEURS

Cliniques médicales	}	MM. PIC
Cliniques chirurgicales		PAVIOT
Clinique obstétricale et Accouchements		TIXIER
Clinique ophtalmologique		BERARD
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques		VORON
Clinique neurologique et psychiatrique		ROLLET
Clinique des maladies des enfants		NICOLAS
Clinique des maladies des femmes		LEPINE (J.)
Clinique d'oto-rhino-laryngologie		MOURIQUAND
Clinique des maladies des voies urinaires		VILLARD
Clinique chirurgicale, infantile et orthopédie		COLLET
Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie		ROCHET
Chimie biologique et médicale		NOVE-JOSSERAND
Chimie organique et Toxicologie		CLUZET
Matière médicale et Botanique		HUGOUNENQ
Parasitologie et Histoire naturelle médicale		MOREL
Anatomie		BRETIN
Histologie		GUIART
Physiologie		LATARJET
Pathologie interne		POLICARD
Pathologie et Thérapeutiques générales		DOYON
Anatomie pathologique		FROMENT
Chirurgie opératoire		CADE
Médecine expérimentale et comparée et bactériologie		FAVRE
Médecine légale		PADEL
Hygiène		ARLOING (F.)
Thérapeutique		Etienne MARTIN
Pharmacie		COURMONT (P.)
Hydrologie thérapeutique et climatologie		SAVY
		LEULIER
		PIERY

PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

Chargé d'un cours de Pathologie externe	MM.	VALLAS
— — Propédeutique de gynécologie		CONDAMIN
— — Chimie minérale		BARRAL
— — Urologie		GAYET

CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES

Anatomie topographique	MM.	THEVENOT (Léon)
Puériculture et hygiène de la première enfance		RIENTER
Chirurgie expérimentale		TAVERNIER
Applications du radium		NOGIER
Stomatologie		TELLIER

AGREGES

MM.	MM.	MM.	MM.
GARIN	MAZEL	DUMAS	MARTIN (Joseph)
TRILLAT	SANTY	DUFOURT	ROCHET (Ph.)
SARVONAT	DUNET	DEVIC	WERTHEIMER
FLORENCE (G.)	CHALIER (André)	GABRIELLE	GATE
ROCHAIX	CHALIER (Joseph)	MANCEAU	BERNHEIM
RIENTER	NOEL		DECHAUME
			POLLOSSON

M. BAYLE, Secrétaire.

EXAMINATEURS DE LA THESE

MM. COURMONT, *président* ; MOREL, *assesseur* ;
 ROCHAIX et MANCEAU, *agregés*.

La Faculté de médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

A MES GRANDS-PARENTS

Témoignage de profonde affection.

A MES PARENTS

Témoignage d'affection et de reconnaissance infinie pour tous leurs sacrifices.

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE
MONSIEUR LE PROFESSEUR PAUL COURMONT

*Professeur d'Hygiène,
Directeur de l'Institut Bactériologique
Officier de la Légion d'Honneur*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR MOREL,
*Professeur de Chimie organique et Toxicologie,
Chevalier de la Légion d'Honneur*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ ROCHAIX,
*Sous-Directeur de l'Institut Bactériologique
Chevalier de la Légion d'Honneur*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ MANCEAU.
Chevalier de la Légion d'Honneur



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545319_0022

Avant-Propos

Arrivée au terme de nos études, c'est un agréable devoir, pour nous, de rendre hommage aux maîtres éminents de la Faculté de Médecine et de l'Institut Bactériologique.

Nos sentiments de reconnaissance vont tout d'abord à M. le Professeur Paul COURMONT. Nous nous souvenons de l'intérêt qu'il nous a témoigné; de sa grande bonté et de la délicate sollicitude avec laquelle il nous a accueilli dans ses services de l'Institut Bactériologique. Nous lui devons beaucoup, nous l'assurons de notre entier dévouement et de notre respectueux attachement.

Nous associons également dans cette pensée de gratitude notre maître direct, M. le Professeur ROCHAIX ; il a bien voulu nous choisir comme collaborateur, et cette marque de confiance et d'estime nous a vivement touchée; avec une affabilité inlassable, il a été pour nous un guide sûr, toujours prêt à nous aider de sa grande compétence ; nous lui devons l'idée de cette

thèse. Le respectueux et fidèle dévouement que nous avons pour lui est un bien faible témoignage de notre reconnaissance.

Depuis notre entrée à l'Institut, M. le Professeur MOREL nous a témoigné souvent beaucoup de sympathie ; en acceptant d'être notre juge, il nous a donné une nouvelle marque de son amabilité, nous l'en remercions vivement.

M. le Professeur agrégé MANCEAU est associé depuis longtemps à nos études ; c'est à lui que nous devons l'orientation de notre carrière médicale et scientifique ; il nous a fait profiter à tout instant de son expérience ; la justesse de ses conseils et la rectitude de son jugement n'ont jamais été mis en défaut. Notre reconnaissance dépasse la puissance des simples mots.

RÉCHERCHES sur le CRITÉRIUM BACTÉRIOLOGIQUE de CONTAMINATION des EAUX POTABLES

Introduction

Les difficultés, auxquelles on se heurte, pour la recherche des germes pathogènes (bacilles typhique, paratyphiques, etc.) et la facilité, au contraire, avec laquelle on décèle le colibacille, hôte normal et constant de l'intestin de l'homme et de animaux, pouvant indiquer, par conséquent, la souillure de l'eau par les matières fécales, ont amené les bactériologistes à attribuer à ce germe, un rôle de témoin, indispensable pour juger de la contamination d'une eau.

Le colibacille, jouant le rôle de test fécal, n'a pas été admis d'emblée comme tel, par les bactériologistes.

En 1893, DUCLAUX (8) considérait l'eau comme l'habitat normal du colibacille, sans que sa présence dans ce milieu fût considérée comme l'indice d'une contamination fécale. Pourtant déjà, en 1885, ESCHERICH avait montré qu'il existe dans le contenu intestinal de l'homme dès les premières heures de sa naissance et qu'on l'y retrouve ensuite d'une façon constante.

Actuellement, personne ne met plus en doute que l'intestin ne soit l'habitat normal du colibacille.

Toutefois, comme le fait remarquer GUILLERD (10) : « Les difficultés commencent lorsqu'il s'agit de préciser les caractères permettant de déterminer le colibacille et de le distinguer de sa propre parenté ; elles se continuent pour fixer en quelle quantité ce germe est tolérable ou non dans l'eau question qui en pose (comme nous le verrons nous-même), une nouvelle, celle de l'origine du *Bacillus coli*.

C'est à ce dernier point que nous nous sommes attachés. Avec M. ROCHAIX, nous avons entrepris une série de recherches, dont les premiers résultats forment les éléments de ce travail. Les résultats sont encore incomplets, mais ils nous ont paru déjà suffisants, pour qu'on puisse en tenir compte et susciter des confirmations.

Nous commencerons par examiner la question de la présence du colibacille, considéré comme indice de contamination de l'eau potable, et essayerons de définir cette espèce, sur les limites de laquelle les bactériologistes ne s'entendent pas toujours.

Nous verrons quelle peut en être la provenance, les méthodes qui ont été utilisées jusqu'ici pour établir son origine dans différents pays.

Nous exposerons enfin les premiers résultats que nous ont permis d'établir nos premières recherches, avec les conclusions qu'ils comportent.

CHAPITRE PREMIER

Le colibacille, indice de contamination de l'eau potable

La recherche et la détermination du taux du colibacille dans l'eau constituent, comme nous l'avons rappelé dans l'Introduction, un des éléments essentiels de l'expertise des eaux potables pour l'appréciation de leur qualité.

Mais, au fur et à mesure que l'expérience se poursuit et se complète, la recherche du colibacille ne paraît pas toujours donner une sûreté suffisante pour guider l'hygiéniste.

Si, lorsque les eaux sont contaminées d'une façon considérable, le colibacille apparaît et souvent à un taux considérable, il n'en est pas de même, lorsque le degré d'infection reste léger. On peut voir monter le nombre total des germes à des chiffres très élevés, apparaître d'autres éléments ayant une signification défavorable, sans que le colibacille soit décelé.

Sa présence peut être intermittente, répondre à des conditions saisonnières et météorologiques (orages, etc.) dont nous ne saisissons pas toujours l'influence.

Inversement, il arrive, de temps à autre, que des eaux renferment du colibacille alors que le nombre global des microbes est réduit, qu'il ne s'y rencontre ni bactéries putrides, ni autres espèces suspectes, que l'analyse chimique aboutit aux conclusions les plus favorables. Il y a ainsi une sorte de contradiction qui laisse l'hygiéniste perplexe et l'amène à condamner une eau qui n'est peut-être pas soumise à une contamination véritable et qui pourrait être consommée sans appréhension.

Une autre difficulté se présente : celle de l'ensemble des caractères attribués au colibacille. Il règne, en effet, une véritable confusion sur ce point. Certains auteurs ont fait du groupe colibacillaire un véritable *caput mortuum* de la bactériologie.

Si tout le monde est d'accord pour considérer le colibacille comme un bacille à extrémités arrondies, aérobic facultatif, dépourvu de capsules, non sporulé, ne prenant pas le gram, des divergences parfois considérables, règnent en ce qui concerne la mobilité, la non liquéfaction de la gélatine, la fermentation du lactose, du saccharose, de la dulcité, la production de l'indol, la réduction du rouge neutre qui sont des caractères habituellement attribués à cette espèce.

Il n'est pas douteux qu'il existe des races de colibacilles, comme il existe des races de pneumocoques, de méningocoques, de streptocoques, etc. Mais il ne faut pas englober dans ce groupe certains microbes qui ne

doivent pas y rentrer, comme le fait, par exemple, MAC CONKEY, en considérant le *Bacillus lactis aerogenes* et le *Bacillus acidi lactici* comme des races de colibacilles.

Il est donc d'abord nécessaire de s'entendre, pour délimiter le groupe du colibacille, avant de rechercher des caractères qui permettent d'en déterminer l'origine fécale.

En pareille matière, il ne peut y avoir de caractères absolument *ne varietur*, mais il existe un ensemble d'attributs morphologiques, tinctoriaux, biochimiques d'une constance suffisante pour qu'on puisse les exiger dans l'identification des colibacilles.

La mobilité peut manquer quelquefois. Tout le monde connaît le colibacille de GILBERT et de LION (9), rencontré par ces auteurs dans une endocardite infectieuse.

Nous ne croyons pas que dans les eaux on ait jamais rencontré de colibacilles immobiles. Il ne semble donc pas qu'on puisse tenir compte, de façon habituelle, de l'absence de ce caractère et les colibacilles devront toujours être considérés comme des bactéries mobiles, la mobilité, fonction du nombre des cils, pouvant d'ailleurs être quelque peu variable.

La liquéfaction de la gélatine doit faire éliminer le colibacille. Jamais ce microbe ne produit la peptonisation de cette substance. Les auteurs américains surtout, qui ont admis l'existence des colibacilles liquéfiant la gélatine, ont certainement fait une confusion avec le *Bacillus cloacae*, certains *Proteus*, le *Bacillus albus liquefaciens*, que l'on rencontre souvent dans les eaux ou beaucoup d'autres saprophytes aquatiques.

En ce qui concerne la fermentation des sucres, le colibacille fait fermenter le glycose, le lévulose, le maltose, le galactose, la mannite d'une façon constante.

La fermentation du lactose, qui a une importance diagnostique particulièrement grande, ne manque jamais, quoi qu'en aient dit certains auteurs. Quelques échantillons peuvent sembler perdre leur propriété fermentative vis-à-vis du lactose, mais comme l'ont montré GRIMBERT et LEGROS, cette propriété s'atténue, devient moins évidente, mais persiste. Au besoin si, par des moyens ordinaires, ce qui est tout à fait exceptionnel, on ne peut la mettre en évidence, le dosage du lactose permettra de constater l'attaque.

Par contre, en ce qui concerne la dulcité et le saccharose, il y a une assez grande variabilité suivant les échantillons. La dulcité est en tout cas beaucoup plus fréquemment fermentée que le saccharose par les diverses races de colibacilles.

Suivant WILLIAM W. BROWN (27), la dulcité serait fermentée de façon constante par le *communis* et le *communior* et la fermentation du saccharose permettrait de distinguer le *communior* qui fait fermenter ce sucre du *communis* qui ne le fait pas fermenter. La non fermentation de la dulcité doit orienter le chercheur vers le *B. aerogenes* et *B. acidi lactici*.

Les opinions divergentes, au sujet des fermentations sucrées, proviennent souvent de l'emploi par les chercheurs de milieux différents. Les résultats sur lesquels nous étayons notre opinion ont toujours été obtenus en eau peptonée sucrée, stérilisée par filtration.

La fonction indologène n'est pas absolument cons-

tante. Le colibacille donne de l'indol en règle générale, mais il n'est pas rare de rencontrer des souches sinon complètement anindologènes, du moins produisant très peu d'indol, surtout dans les eaux. ACHARD et RENAULT (1) en ont signalé dans les infections urinaires qui n'en donnaient pas. LEMBKE (12), et après lui d'autres auteurs, avaient créé un type spécial, le *B. coli anindolicum*. En réalité, la fonction indologène existe presque toujours, mais par une méthode donnée (SALKOWSKY ou EHRLICH), on observe des variations considérables dans la quantité d'indol mise en évidence, et l'on verra plus loin le parti qu'on a tiré de ce fait pour déterminer l'origine fécale des espèces colibacillaires.

Quant à la réaction du rouge neutre, elle est à peu près constante. Certains auteurs ont signalé des races de coli ne réduisant pas le rouge neutre. Cela tient vraisemblablement à une faute de technique dans la préparation du milieu, en particulier à l'addition de sucre (glycose ou lactose), car l'acidité produite au cours de l'attaque de cette substance empêche souvent la réaction qui est due à des phénomènes de réduction en milieu alcalin.

Certains auteurs ont prétendu cependant que l'addition du glycose était nécessaire pour empêcher la précipitation de cristaux rougeâtres, en rapport avec l'alcalinisation.

En réalité, le glycose n'a pas même cette utilité ; au cours de la préparation du bouillon de viande, cette dernière donne naissance à une petite quantité de matières sucrées dont la fermentation est suffisante pour

empêcher le phénomène précédent de se produire. Le virage du rouge neutre est une des réactions biochimiques les plus constantes du colibacille. Grâce à tous ces faits, nous pourrions donner une définition, tout au moins provisoire, du colibacille et permettre aux bactériologistes et hygiénistes de s'entendre sur ce point.

On peut donc définir le colibacille : un bacille à extrémités arrondies, aerobie facultatif, plus ou moins mobile, dépourvu de capsules, non sporulé, ne prenant pas le gram, ne liquéfiant pas la gélatine, faisant fermenter le lactose, le glycole, le levulose, le maltose, le galactose, la mannite, pouvant pour certaines races faire fermenter la dulcité et le saccharose, donnant habituellement de l'indol décelable par les réactifs classiques, réduisant le rouge neutre.

Ce n'est qu'exceptionnellement qu'un des caractères indiqués comme constant peut manquer.



En outre, à côté du colibacille proprement dit, il faut tenir compte des *bacilles coliformes*. MANDOUX et GRUAT (17), ont, en 1915, appelé l'attention sur leur importance et apporté des exemples tout à fait caractéristiques. Des puits ayant manifestement provoqué des cas de fièvre typhoïde, ne renfermaient pas de colibacille vrai, mais des bacilles coliformes. Et ils arrivaient à formuler cette conclusion : « Nous devons nous attacher à déceler dans l'eau la flore fécale humaine dont le coli ne présente qu'une seule espèce, flore comprenant tout un groupe de germes ayant

comme caractères communs de produire l'indol, de faire virer le rouge neutre, se comportant d'une façon variable vis-à-vis de la gélatine et des sucres, alors que les espèces voisines, d'origine animale, ne produisent pas d'indol ne virent pas le rouge neutre et sont souvent agglutinables par les sérums normaux de bœuf ou de cheval. » Dès 1915, la recherche du seul colibacille avait donc apparu comme insuffisante à ces deux auteurs.

En somme, le colibacille peut donc apparaître comme un témoin infidèle de la contamination de l'eau, et il est nécessaire d'associer la recherche d'autres espèces appartenant à la flore fécale et en second lieu, il arrive que le colibacille peut ne pas avoir la signification d'indice de contamination.

Il est donc nécessaire de rechercher si les colibacilles fraîchement émis ne présentent pas certains caractères particuliers permettant de leur attribuer la signification certaine d'indice de contamination, et d'autre part de rechercher d'autres espèces suffisamment constantes de la flore fécale.

CHAPITRE II

Origine du colibacille dans l'eau

Le colibacille trouvé dans l'eau peut provenir des matières fécales humaines et, dans ce cas, il prend toute sa valeur d'indice de contamination. L'eau souillée par le colibacille de cette origine peut véhiculer les germes des maladies humaines intestinales : fièvres typhoïdes, paratyphoïdes, choléra, dysenteries, etc., et devenir la cause des épidémies d'origine hydrique. Une telle eau doit être proscrite d'une façon absolue de l'alimentation.

Mais le colibacille peut aussi provenir de matières fécales d'origine animale. Dans ce cas, le danger est moindre. Les maladies précédemment citées étant exclusivement humaines, surtout en ce qui concerne les infections typhoïdes, on conçoit que sa découverte dans l'eau ne présente pas une gravité aussi grande, au point de vue de la propagation de ces maladies.

Il n'en reste pas moins vrai que ces eaux sont de

mauvaise qualité et peuvent produire des troubles gastro-intestinaux, d'allure quelquefois banale, mais que, de toute évidence, il y a intérêt à éviter.

C'est surtout à la campagne, lorsqu'il s'agit de puits voisins des fumiers et des écuries, que les eaux sont souillées par des matières fécales d'origine animale. A. DE MAGALHAES (16) conclut, de ses recherches de 1924, qu'on n'a pas encore trouvé de méthode qui permette de distinguer les colibacilles de l'intestin de l'homme de ceux des animaux, les premiers seulement ayant un véritable intérêt épidémiologique.

A. BETTENCOURT et BORGES (2) ont essayé de différencier les colibacilles d'origine humaine de ceux d'origine animale, à l'aide de la réaction de fixation du complément, mais leurs essais ont complètement échoué.

Enfin, le colibacille est un micro-organisme qui peut devenir ubiquitaire. Il peut vivre et même se multiplier dans les milieux extérieurs. L'origine fécale du bacille, devenu ainsi saprophytique, reste, mais sa survivance dans la nature, sa dispersion par les poussières (matières fécales humaines ou animales desséchées, etc), son ensemencement secondaire dans des milieux naturels, qui lui permettent de végéter et même de se multiplier, lui enlèvent sa signification d'indice de contamination.

Il serait donc utile aussi de rechercher si ces colibacilles, devenus saprophytiques, ne possèdent pas certains caractères positifs ou négatifs permettant de les distinguer de ceux qui ont été fraîchement émis avec des matières fécales humaines ou animales.

Jusqu'ici, la notion de quantité était le seul criterium adopté. Il est bien évident que, lorsqu'il se produit un déversement ou une infiltration quelque peu importante de matières de vidange dans l'eau, le nombre de colibacilles s'élève à des taux pouvant être considérables et souvent d'une façon brusque, alors que l'apport de colibacilles saprophytiques ne peut jamais être très important. Mais à côté des cas typiques, il en existe d'autres et ce ne sont peut-être pas le moins nombreux, où ce criterium se trouve en défaut.

La découverte ou la mise au point des caractères auxquels nous faisons allusion présente donc un intérêt certain.

CHAPITRE III

Méthodes actuelles de détermination de l'origine du colibacille

Dans certains pays, on s'est déjà préoccupé d'établir des méthodes permettant de remonter à l'origine des colibacilles décelés dans l'eau. Nous allons exposer celles qui ont été adoptées dans plusieurs d'entre eux.

I. — Méthodes françaises

Il est évident que la détermination des nombreux germes, susceptibles d'être rencontrés dans l'eau, permet d'avoir des renseignements sur sa pureté ; mais seuls les germes pathogènes ont une importance capitale ; ici, la qualité domine la quantité. Malheureusement, sur les milieux de culture ordinaires, les bactéries banales prennent vite le pas sur les autres : en

particulier sur les bactéries d'origine fécale ; les méthodes françaises tiennent compte de ces difficultés et elles ont toutes pour but de chercher un « *test fécal* ». C'est surtout le colibacille qui a été choisi comme test. La méthode au rouge neutre, que nous étudierons plus loin, a l'avantage précieux de s'appliquer, non seulement au colibacille, mais aussi à tout un groupe de microbes d'origine très homogène, puisqu'ils proviennent des matières fécales de l'homme et des animaux, des fumiers et des purins. Citons parmi ces bactéries :

Le *B. coli* le plus commun, le *B. cloacae*, le *B. enteritidis*, celui de *hog-choléra*, les *paratyphiques A* et *B*, le *proteus*, les *urobactéries*, etc.

Le colibacille est décelé avec facilité à l'analyse ; tous les bactériologistes, sauf peut-être DUCLAUX (8) accordent à ce germe une origine presque toujours fécale. La grande difficulté est de distinguer le colibacille de sa propre parenté et de fixer les quantités maxima pour une eau potable, mais il est admis que ce germe ne peut se multiplier dans les eaux pures ; enfin il n'a peut-être pas le caractère d'ubiquité qu'on lui a prêté.

VINCENT, BOUQUET et MARREC ont montré qu'il existait en quantité infime dans les terres forestières. Nous admettrons donc sa liaison étroite avec la présence de l'homme et des animaux.

Tous les milieux étudiés et proposés dans les méthodes françaises ont pour but de sélectionner, en quelque sorte, le colibacille, et de mettre en évidence les propriétés biologiques caractéristiques.

Les méthodes principales françaises reposent sur les principes suivants :

1° Le colibacille peut supporter dans les milieux une certaine proportion d'acide phénique capable d'empêcher le développement d'autres germes ;

2° Le colibacille, en dégradant les protéines et peptones des milieux, est capable de fournir de l'indol aux dépens du tryptophane ;

3° Le colibacille produit la fermentation du lactose ;

4° En milieu alcalin, il se comporte comme un puissant réducteur ⁽¹⁾ et il donne, avec le rouge neutre, une fluorescence verte avec virage au jaune canari.

Méthode utilisant la formation d'indol

A) *Préparation du milieu peptoné* (GUILLERD) (10).
« Faire dissoudre à l'ébullition 60 gr. de peptone et
« 20 gr. de sel par litre. Neutraliser avec NaOH N/10
« jusqu'à alcalinité légère et porter à l'autoclave 5 minutes à 110°. Filtrer sur papier Chardin humide et
« compléter le volume à 1000 cm³. Ajouter alors
« 2 gr. 40 d'acide phénique pur et après dissolution
« répartir par 50 cm³ dans les vases de culture que
« l'on stérilise 20 minutes à 110°. »

B) Certains laboratoires remplacent la peptone par la levure autolysée dont le prix est 50 fois plus faible.

Technique. — Suivant la richesse soupçonnée en colibacilles de l'eau à analyser, on ensemence chaque vase de culture renfermant 50 cm³ de bouillon phénique avec :

25 cc., 10 cc., 5 cc., 0 cc. 5, d'eau à examiner et on

(1) Nous avons dit plus haut que d'autres bactéries d'origine fécale se comportaient aussi comme de puissants réducteurs,

complète à 100 cc. avec de l'eau stérile. Chaque ballon est réparti dans 10 tubes à essai (10 cm³ par tube). Les tubes portés à l'étuve à 42° pendant 48 heures.

Les tubes ayant cultivé sont additionnés de 2 cm³ de réactif acide sulfurique nitreux, ou de réactif d'ERLICH dont la composition est la suivante :

Paradiméthylaminobenzaldéhyde	4 gr.
Alcool à 95°	380 cc.
Acide chlorhydrique pur	80 cc.

L'indol est décelé par l'apparition d'une couleur rouge à la séparation des deux liquides. Chaque tube donnant de l'indol est considéré comme n'ayant reçu qu'un colibacille lors de l'ensemencement. On établit facilement la teneur en colibacilles par litre.

DIENERT et GUILLERD, se basant sur environ 8.000 observations, admettent qu'un B. coli est d'autant plus indologène qu'il est plus récemment issu de l'intestin. Il faut donc mesurer les quantités d'indol formées ; on prépare une *gamme d'indol*. On fait une solution type d'indol au 1/10.000. On verse dans six tubes identiques :

a) 5 cc. de solution type que l'on complète avec	10 cc. eau distillée
b) 3 cc. — — — — —	10 cc. —
c) 2 cc. — — — — —	10 cc. —
d) 1 cc. — — — — —	10 cc. —
e) 0 cc. 5 — — — — —	10 cc. —
f) 0 cc. 25 — — — — —	10 cc. —

On ajoute dans chaque tube 4 cm³ d'alcool amylique, on agite doucement et on additionne de 2cm³ de réactif chlorhydrique nitreux. On note l'apparition d'un anneau rouge d'intensité décroissante,

<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
20.000	33.000	50.000	100.000	200.000	400.000

Les tubes ayant cultivé à l'étuve pendant 48 heures traités de la même façon, on cherche la teinte correspondante avec les tubes de la gamme.

« Il y a toujours forte présomption que les *B. coli* « donnant des indols égaux ou supérieurs 1/50,000 « sont des germes frais, d'origine récente, et qu'il s'est « écoulé peu de temps entre leur émission et leur si- « gnalement dans l'eau analysée. »

Méthode utilisant le virage du rouge neutre

L'action réductrice, en solution alcaline, du colibacille vis-à-vis du rouge neutre, avait déjà été mentionnée par ROTHBERGER (22), en 1898, et par BRAUN (5), en 1906 ; SAVAGE (23) proposait, en 1901, l'emploi d'un bouillon glucosé. Mais c'est M. ROCHAIX (20) qui, par une série d'études (1909-1917), a mis au point l'utilisation de cette réaction. Il a démontré que le rouge neutre en solution alcaline est transformé en son hydrobase, sous l'action des réducteurs et donne une coloration jaune canari en rapport avec l'alcalinité, accompagnée d'une fluorescence verte, facteur de la réduction.

Certains auteurs ayant mentionné des colibacilles ne réduisant pas le rouge neutre, M. ROCHAIX (20) a montré que c'était fréquemment l'addition de sucre au milieu qui gênait la réduction (voir chapitre I) par suite de la formation de l'acide correspondant (lactique, etc).

Préparation du milieu. — La préparation du bouillon au rouge neutre a été exposée maintes fois, mais nous attirons l'attention sur les soins minutieux qui doivent être apportés dans sa préparation. Le rouge neutre doit être chimiquement pur (les rouges neutres de certaines firmes sont absolument inutilisables) et dans la préparation du milieu, deux temps sont particulièrement délicats, la cuisson de la viande qui doit être très peu poussée, et l'alcalinité qui doit rester presque à la limite, très voisine de la neutralité.

Technique. — Ensemencer 1/2 cc., 1 cc., 2 cc., 5 cc., 10 cc., 20, d'eau à analyser, dans 1/2 cc., 1 cc., 2 cc., 5 cc., 10 cc., 20 cc. de bouillon au rouge neutre. Mettre à l'étuve à + 42°, noter les tubes donnant le virage jaune canari par transparence avec fluorescence verte par réflexion, dans les 48 heures.

Critique des méthodes

1. La méthode utilisant la formation d'indol est une méthode spécifique, opérant une sélection microbienne. La gamme d'indol de DIENERT et GUILLERD apporte une notion importante, quant à la potabilité de l'eau. Si la contamination est récente, les germes pathogènes (*B. typhique*, paratyphique) peuvent subsister dans l'eau.

2. La méthode du rouge neutre n'est pas spécifique puisqu'elle s'étend aux microbes des matières fécales, des purins et des fumiers, mais elle est rapide, décèle la contamination au bout de 24 heures : c'est un indice certain de contamination par les matières fécales.

II. — Méthodes allemandes

C'est le bacille coli qui est pris comme « *test fécal* » ; la contamination d'une eau par les déjections animales est prouvée par la présence du bacille en « *quantité importante* ».

Les méthodes sont basées, soit sur le développement des cultures à haute température 46°, soit sur des milieux additionnés de produits organiques susceptibles de donner des colorations variées sous l'influence du bacille coli et des bactéries d'origine fécale. Passons en revue les méthodes les plus éprouvées.

Méthode d'Eykman (8 bis) 1904

Principe. — A une température élevée 46°, les bactéries banales ne peuvent fructifier sur le milieu de culture choisi ; seuls le colibacille des animaux à sang chaud est capable de produire des fermentations, en particulier celles du glucose.

Technique. — Milieu choisi :

Glucose	10 g.
Peptone Witte.....	10 g.
Sel marin.....	5 g.
Eau distillée	100 g.

Prendre la réaction du milieu après la stérilisation ; au besoin, neutraliser par quelques gouttes de NaOH N/10.

Eau à analyser.... 50 à 100 cm³

Milieu 1/8 du volume de l'eau

On porte à l'étuve dans un tube de SMITH, en évitant la formation de bulles d'air dans la branche fermée. Après le séjour à l'étuve, on examine la nature des gaz formés dans la branche fermée à l'aide des réactifs appropriés (solution de soude pour CO_2 , combustion de l'H pour ce dernier gaz).

BULIR a modifié cette méthode en introduisant dans le milieu un peu de mannite et du rouge neutre à 1/100 ; il note le gaze et le virage au jaune vert fluorescent.

LOHNIS (14) utilise une technique permettant de reconnaître globalement la flore fécale. Il emploie un bouillon de viande additionné pour 1.000 de 0 gr. 50 d'esculine (1) et de 0 gr. 50 de citrate de fer.

Technique. — Une partie déterminée de ce milieu estensemencée avec des dilutions d'eau suffisantes et, après un séjour à l'étuve de 38-40°, on note les cultures qui ont noirci.

Cette réaction n'est pas spécifique, d'autres bactéries et même des levures et moisissures peuvent colorer en noir le bouillon. Cette méthode fournit malgré cela de bonnes indications. La plupart des auteurs allemands donnent leur préférence à la méthode d'EHKMAN (8 bis) et la considèrent comme un indice certain de contamination fécale.

Critique de ces méthodes

Elles ont l'inconvénient de ne pas sélectionner les germes, comme le font les méthodes françaises, à

(1) Par suite de la présence de l'esculine, ce milieu n'est pas stérilisé à l'autoclave.

l'acide phénique ; aussi les auteurs allemands insistent sur la nécessité d'isoler et de caractériser le germe, ce qui diminue la rapidité de l'analyse.

En France, SICRE a montré qu'à 46° beaucoup de colibacilles perdaient toute vitalité et que d'autres bactéries pouvaient fermenter les sucres à 50°.

BORNAND (4) a constaté que les *B. coli* ayant subi à 16-18° une macération de plusieurs mois, perdent la faculté de se développer à haute température et ne produisent plus d'indol.

Conclusions. — La méthode d'EIJKMAN ne peut traduire qu'une contamination « récente » ce qui est déjà bien, mais peut être infidèle dans certains cas.

III. — Méthodes belges

Principe. — Elles utilisent les milieux phéniqués, mais après 48 heures d'étuve à 38° on repique les cultures obtenues sur gélose lactosée et inclinée additionnée d'une solution minérale complexe.

Eau distillée	200cm ³
Phosphate bipotassique	1,5
Azotate d'ammoniaque	20
Carbonate de soude.....	2
Sulfate de soude	2
Sulfate de magnésie	3,5
Sulfate de potasse	0,5

Ce milieu serait spécifique du *B. coli* qui donnerait au bout de 48 heures des colonies crémeuses caracté-

ristiques et présenterait au microscope un aspect typique en 8 allongé, très grand.

Critique

Cette méthode est longue, il faut passer de la gélose minérale à l'eau peptonée pour y poursuivre la réaction de l'indol.

IV. — Méthodes anglaises

Les méthodes anglaises portent sur l'eau ayant subi une auto-épuration, c'est la méthode de « *Storage* » qui précède l'analyse proprement dite.

Grâce à cette véritable sédimentation, une réduction microbienne de l'ordre de 96 % s'effectue en quelques semaines.

Le *Bacterium coli* diminue dans les mêmes proportions, les bactéries pathogènes (typhique et cholérique) disparaissent même complètement si le délai de sédimentation est suffisant.

Le « *storage* » facilite grandement l'analyse dont le principe est basé sur la fermentation des sucres, lactose ; ici, l'originalité des méthodes vient de l'addition de sels biliaires (taurocholate de soude) au milieu de culture.

Dans la marche de l'analyse proprement dite, il y a deux épreuves.

1. *Epreuve primaire* portant sur 1 cc. et 10 cc. d'eau

à analyser. Si les deux épreuves sont négatives, l'eau est bonne. Si, dans cette épreuve, 1 cc. donne des résultats négatifs et les 10 cc. des résultats positifs, l'eau est, selon le terme admis, « *protestée* » et soumise aux épreuves secondaires.

2. *Epreuves secondaires.* — On part des 10 cc. ayant donné des résultats positifs et l'on ensemence une ose du tube dans 10cm³ d'eau stérile ; on ensemence une ose de cette 2^e dilution dans le milieu Lacto Salt bile pour y vérifier la fermentation et dans le milieu à peptone pour y suivre la production d'indol.

On porte à l'étuve et 37° pendant 24 heures et on examine, à l'aide du réactif d'Ehrlich, la présence ou l'absence d'indol et on vérifie si le milieu lactosé a fermenté. On en tire les conclusions.

Bien entendu, des modifications portant sur la quantité d'eauensemencée et le plus ou moins grand nombre d'expériences peuvent être apportées à cette technique.

Critique de la méthode anglaise

Elle a comme avantage :

1° Le « *storage* » ;

2° Les épreuves secondaires qui vérifient neuf fois sur dix les épreuves primaires. La superposition du pouvoir ferment et de la production d'indol augmente la sensibilité de la méthode.

V. — Méthodes américaines

Les méthodes américaines sont basées sur la fermentation des sucres, en particulier du lactose. Plus de milieux sélectifs à l'acide phénique, comme en France, pas de culture à 46° comme en Allemagne, pas de sels biliaires dans les milieux comme en Angleterre.

Le principe est le suivant : le bacille coli, comme d'ailleurs les germes d'origine intestinale, fait fermenter le lactose. Il faut reconnaître que cette affirmation n'a pas été admise sans réserve. SCHOBEL et RAMIREZ (24) récusent cette propriété comme test de la pollution fécale des eaux.

Les Américains sont allés plus loin, ils ont cherché à faire une discrimination entre les espèces de *bacterium coli* vivant normalement dans l'intestin de l'homme et des animaux et celles que l'on trouve en ouvrant les graines d'avoine et d'autres graines sèches avec toutes les précautions d'asepsie ; mais là encore, on peut se demander si le *bacterium coli* ne serait pas puisé dans le sol par la plante et véhiculé par la sève brute jusqu'aux organes reproducteurs. Malgré cette hypothèse que nous vérifierons plus tard, les savants américains ont divisé le vaste groupe du coli en deux sous-groupes :

1. *Groupe du coli* proprement dit, ayant pour origine les fèces et le sewage ;
2. *Groupe du coli arrogenes*, ayant pour origine le sol et les graines.

Dès 1912, HOWE avait fait des réserves sur le pouvoir spécifique et la production d'indol par le coli d'origine intestinale.

MAX LEWINE (13), par contre, avait indiqué que la réaction de l'indol était donnée par 90 % des bactéries d'origine fécale.

Réaction du rouge de méthyle

Howe et après lui Mac Conkey ont constaté que le 2^e groupe seul (*aerogenes*) faisait fermenter le saccharose, le 1^{er} groupe ne donnait rien.

En restant sur le terrain « *fermentaire* », HARDEN et WALPOLE (1905-1906) ont précisé les quantités d'acides formés au cours de la fermentation du glucose. Ces auteurs ont montré que les proportions d'acides et, par suite, des ions H^+ formées étaient très élevées avec les bactéries coli d'origine intestinale et faibles avec les bactéries coli du sol et des graines. Ces résultats ont été confirmés par KEYER et GILLEPSIE, ROGERS, EVANSEN, etc., et ils ont établi un rapport $\frac{CO^2}{H}$

où la grandeur du dénominateur H dépend de la proportion des bactéries coli d'origine fécale.

Il suffit, en somme, de déterminer par cette méthode la concentration en ions hydrogène, autrement dit de mesurer le PH des milieux après culture.

CLARKS, à qui l'on doit une échelle d'indicateur pour le PH a établi, dès 1915, une corrélation entre le volume gazeux et la concentration en ions hydro-

gène. L'indicateur choisi a été le rouge de méthyle et la réaction est connue sous le nom de réaction au rouge de méthyle qui vire au jaune avec les alcalins et au rouge vif si la concentration en ions H est forte.

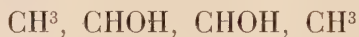
Le principe de cette méthode est donc de cultiver les bactéries coli sur des milieux additionnés de rouge de méthyle.

Le *bacillus coli aerogènes* donne avec ce milieu une coloration jaune; le *B. coli* d'origine fécale donne une coloration rouge vif.

Réaction de Voges-Proskauer

Principe. — L'acétylméthylcarbinol, substance réductrice volatile, additionnée de potasse, donne, en présence de peptone, une coloration rose éosine.

Or, ce corps chimique est un produit d'oxydation du butylène glycol :



Ce corps prend naissance au cours de la fermentation du glucose, sous l'influence du bacille coli.

Les germes du groupe aerogènes sont capables d'opérer l'oxydation précitée et donnent une teinte rose, par contre, les bacilles coli d'origine fécale sont incapables de produire cette oxydation.

Cette réaction, vérifiée au cours de nombreux travaux, a été mise à profit pour déceler le *bacterium coli* d'origine fécale en particulier (MAC CONKEY, LEWINE (13).

M. ROCHAIX (20), de son côté, a appliqué ces réac-

tions sur 18 souches de bacilles coli, isolés des matières fécales.

Ses observations portent à la fois :

Sur la non fermentation du saccharose notée dans 72 % des échantillons :

Réaction du rouge de méthyle : positive 88,8 % ;

Réaction de Voges Proskauer : négative, 94,4 % ;

Recherche de l'indol : positive, 100 %.

Pour cet auteur, ces trois dernières réactions ont une réelle valeur de diagnostic.

Méthode de Koser

Une autre réaction étudiée par KOSER repose sur le principe suivant : les bacilles coli d'origine fécale sont incapables d'utiliser l'azote fourni par les bases puriques, en particulier, l'acide urique. Les bacilles coli aerogènes peuvent dégager l'azote des purins.

Sur des milieux appropriés où l'azote est fourni par des purins, le bacille coli d'origine fécale ne pourra se développer; seuls les germes du groupe aerogènes pourront fructifier.

Après ensemencement sur ces milieux spéciaux, on porte à l'étuve pendant 4 jours à + 37° et on note la présence ou l'absence de cultures.

Cette réaction de KOSER a été vérifiée par d'autres auteurs, dont CHEN, RETTGER et LEWINE (13).

KOSER a modifié son milieu en remplaçant les purines par des sels d'ammonium (azotates et chlorures) et en ajoutant du citrate de soude.

Cette modification n'est pas heureuse, car les résul-

tats obtenus sont sujets à caution, comme le reconnaît son auteur.

Nous avons signalé plus haut qu'en étudiant la potabilité des eaux de Manille, des savants philippins avaient fait de grandes réserves sur l'essai des bactéries capables de fermenter le lactose, comme indice certain de la pollution fécale des eaux.

TEAGUE et LEWINE (13) ont eu l'idée de modifier les milieux et de les additionner d'éosine et de bleu de méthylène et d'étudier l'aspect morphologique des cultures produites par les deux groupes de bacilles :

Bacilles coli d'origine intestinale ;

Bacilles coli aërogènes du sol.

LEWINE (13) a pris en considération les caractères morphologiques suivants :

1° Dimension des cultures ;

2° Leur confluence ;

3° L'aspect par transparence (couleur, dessins formés) ;

5° L'aspect par réflexion (couleur, dessins formés).

En comparant par antithèse les différents aspects présentés par les cultures des deux sortes de coli, il est arrivé aux chiffres suivants :

A. — Aspect de coli intestinal.....	102 colonies
Identification définitive : 96,9 %.	
B. — Aspect de coli aërogènes.....	122 colonies
Identification définitive : 82,4 %.	

Ces résultats sont satisfaisants et peuvent servir à la différenciation rapide et courante des deux sortes de bactéries.

L'effort des savants américains ne s'est pas arrêté

là ; les chercheurs, en particulier RAMIREZ et SCHLOBL (24) ont voulu pousser plus loin la discrimination des colibacilles et ont cherché à différencier les colibacilles d'origine humaine et d'origine animale. Ils ont offert au *bacillus coli* de l'homme et des animaux des milieux additionnés des sucres les plus divers : arabinose, xylose, galactose, rhamnose, levulose, raffinose, adonite, mannite et même des glucosides comme l'amygdaline ; à la vérité, en essayant ces sucres, les auteurs ont méconnu, tout au moins pour l'arabinose, les lois de la fermentation (sucres en C^3 ou multiple de 3) et pour les autres les préférences héréditaires des bactéries habituées à telle ou telle forme optique (PASTEUR) ; il semble que ce manque de méthode soit en partie la cause de leurs insuccès.

En résumé, on peut dire qu'à l'heure actuelle il n'existe pas encore de méthodes permettant de différencier les colibacilles d'origine humaine et d'origine animale.

Critiques de la méthode américaine

Ce qu'il faut retenir, toutefois, comme avantage de la méthode américaine, c'est qu'elle est le premier essai de standardisation des méthodes.

Le principe de ces méthodes est tout d'abord de conditionner étroitement :

1° *La préparation des milieux de culture* (soit à l'aide de tampons types, soit par la méthode colorimétrique) ;

2° *La réglementation des épreuves d'analyse* ;

- 1° Analyse présomptive ;
- 2° Analyse de confirmation partielle ;
- 3° Analyse complétée.

Comparaison avec les méthodes françaises

Les méthodes françaises dont le criterium est la fermentation du lactose semblent ignorer le groupe de l'aerogènes.

MACÉ (15) donne à ce dernier groupe une signification aussi défavorable que celle du *Bacterium coli* et lui attribue aussi un habitat fécal. Habitat plus banal, disent les Américains.

De nouvelles recherches à la suite de LEWINE sont indispensables pour éclaircir la question.

CHAPITRE IV

Recherches personnelles

En nous basant sur les méthodes déjà utilisées que nous venons d'exposer, nous avons commencé, sous la direction de M. ROCHAIX à chercher à établir des méthodes suffisamment sûres permettant de déterminer l'origine des colibacilles.

Nos recherches ont porté :

1° SUR DES COLIBACILLES D'ORIGINE HUMAINE (matières fécales et urine) ;

2° SUR DES COLIBACILLES D'ORIGINE ANIMALE (matières fécales) ;

3° SUR DES COLIBACILLES ISOLÉS DES EAUX CONTAMINÉES ;

4° SUR LES TRANSFORMATIONS QUE PEUVENT SUBIR LES COLIBACILLES FRAICHEMENT ÉMIS AU COURS DE LEUR SÉJOUR PLUS OU MOINS PROLONGÉ DANS L'EAU.

L'isolement des colibacilles des matières fécales a été fait sur boîte de gélose lactosée tournesolée ou sur milieu d'Endo.

Après examen microscopique d'une parcelle de matières fécales pour se rendre compte de sa richesse en germes, et par conséquent du taux de dilution nécessaire, nous avons, suivant la méthode habituelle, émulsionné une parcelle de ces matières à l'aide d'une öse, dans de l'eau physiologique stérile. A partir de cette première émulsion donnant un trouble très net, des dilutions ont été faites jusqu'à obtention d'un louche très faible.

C'est à partir de cette dernière émulsion que l'ensemencement est fait sur deux boîtes de gélose lactosée tournesolée.

Les boîtes mises à l'étuve à + 37° donnent au bout de 24 heures des colonies rouges.

Ces colonies nous ont permis d'obtenir des cultures pures pour l'identification, et nous n'avons considéré comme colibacilles que les microbes qui répondaient aux caractères que nous avons énumérés dans le Chapitre I.

*
* *

L'isolement des colibacilles des eaux a été fait en partant des cultures en bouillon phéniqué suivant les méthodes classiques.

*
* *

Nous avons soumis les différentes souches de

colibacilles isolés, au nombre de 54, à une série de réactions, permettant d'établir des caractères de différenciation

Un certain nombre de ces caractères avaient déjà été proposés et sont couramment utilisés, en particulier aux Etats-Unis depuis 1923. La « *Standard method of water analysis* » (24 bis) impose même leur recherche aux laboratoires officiels de ce pays. Ce sont :

- 1° L'ÉPREUVE DU ROUGE DE MÉTHYLE ;
- 2° LA RÉACTION DE VOGES PROSKAUER ;
- 3° L'ÉTUDE DE LA FERMENTATION DE L'ADONITE ;
- 4° LA RECHERCHE DE L'INDOL ;
- 5° L'ÉTUDE DE LA FERMENTATION DU SACCHAROSE.

Mais nous avons écarté le caractère tiré de la liquéfaction de la gélatine, qui, comme nous l'avons dit précédemment, ne fait pas partie des attributs normaux de colibacille.

Nous avons par contre essayé d'établir un nouveau caractère de différenciation basé sur la fermentation produisant le dédoublement de l'esculine en glycose et esculétine.

En 1909, HARRISSON et VAN DER LERCK (11) avaient pensé rechercher le colibacille dans l'eau en employant un bouillon-esculine additionné de sels biliaires. L'esculine, glycoside extrait du Marron d'Inde, se dédouble sous l'influence de certains microbes en glucose et esculétine qui a la propriété de donner une coloration plus ou moins noirâtre, en présence du citrate de fer. F. LOHNIS (14), comme nous l'avons vu précédemment, a fait de cette réaction une techni-

que permettant de déceler une contamination globale par les matières fécales, une réaction ayant en somme la même signification que celle du rouge neutre en France.

M. ROCHAIX (20), en 1923, a repris l'étude de ce caractère sur 51 colibacilles d'origine différente : matières fécales, urine, de collection, des eaux. Il conclut que le dédoublement de l'esculine, qui s'apprécie pratiquement par le noircissement du milieu au niveau des colonies sur milieu à l'esculine additionné de citrate de fer, n'est pas constante et ne constitue pas pour le colibacille un caractère biochimique de différenciation de réelle valeur. Mais il est à remarquer dans le tableau qu'il a publié, que les bacilles isolés, récemment des matières fécales ou provenant récemment d'urines (pyélo-néphrites) donnent des colonies noires alors que les bacilles isolés des eaux ou provenant de collections (Lyon, Nancy, Lausanne) ne donnent la réaction qu'en très grande minorité.

Nous avons repris l'étude de cette réaction, et nous avons essayé d'établir s'il n'y avait pas une corrélation entre l'apparition, le nombre des colonies noires, et la contamination plus ou moins récente de l'eau. Ces recherches ont été faites avec des eaux exemptes de colibacilles, contaminées artificiellement avec des colibacilles fraîchement émis (d'origine humaine et animale) dont nous avons déterminé la réaction sur gélose à l'esculine. Ces mêmes colibacilles isolés de l'eau, après un séjour de 5, 18 et 22 jours, et ensemencés sur gélose à l'esculine, nous ont permis de noter les transformations que subissait cette réaction,

suivant que la contamination était plus ou moins récente.

I. — Technique

a) MILIEU A LA PEPTONE POUR LA RÉACTION DU ROUGE DE MÉTHYLE. *Pour 1 litre :*

1° Ajouter à 800 cm³ d'eau distillée 5 grammes de peptone Protéose ou Difco, ou de Witte (les autres peptones ne pourraient les remplacer), 5 grammes de dextrose et 5 grammes de phosphate bipotassique (K²H PO⁴). Une solution diluée de K²H PO⁴ donnera une couleur rose nette avec la phénolphthaleine.

2° Chauffer en remuant de temps à autre pendant 20 minutes.

3° Filtrer sur papier filtre plissé, refroidir à 20° et étendre à 1.000 cm³ avec de l'eau distillée.

4° Repartir en tubes stérilisés (10 cm³ par tube).

5° Stériliser par la méthode intermittent pendant 20 minutes, trois jours de suite (1).

Solution indicatrice : Dissoudre 0 gr. 1 de rouge de méthyle dans 300 cm³ d'alcool et étendre à 500 cm³ avec de l'eau distillée.

TECHNIQUE DE LA RÉACTION :

Nous avonsensemencé chaque échantillon dans 10 cm³ de bouillon au phosphate de potassium et dextrose. Après cinq jours d'incubation à 30°, nous

(1) Pour parer aux inconvénients d'une stérilisation à l'autoclave, étant donné la présence du dextrose, nous avons stérilisé le milieu par filtration sur bougie Chamberland (F.) sous pression.

prélevons 5 cm³ de la culture auxquels nous ajoutons 5 gouttes de la solution de rouge de méthyle.

La réaction est positive lorsqu'on note l'apparition d'une couleur rouge nette, négative lorsqu'on obtient une couleur jaune.

b) RÉACTION DE VOGES PROSKAUER :

Aux 5 cm³ restant de la culture en bouillon au phosphate de potassium et au dextrose, on ajoute 5 cm³ d'une solution de potasse caustique à 10 %. On laisse reposer toute la nuit. Une réaction positive est donnée par l'apparition d'une couleur rose éosine.

c) RECHERCHE DE L'INDOL :

Lesensemencements en eau peptonée ont été laissés 48 heures à l'étuve à 37°. La formation d'indol est mise en évidence à l'aide du réactif d'Erlich.

On ajoute 2 cm³ de réactif, la présence d'indol est révélée par une couleur rouge insoluble dans le chloroforme.

Se reporter d'ailleurs au chapitre III, paragraphe 1.

d) BOUILLONS D'ADONITE ET DE SACCHAROSE :

Ces bouillons sont préparés suivant la technique générale et stérilisés par filtration sur bougie Chamberland (F) sous pression.

Les cultures ayant été laissées 48 heures à l'étuve à 37° on note au bout de ce laps de temps la formation de gaz et la fermentation.

e) GÉLOSE A L'ESCULENE CITRATÉ :

Dans 1.000 cm³ d'eau, faire bouillir jusqu'à dissolution complète :

Peptone de Wite..... 10 grammes.

Sels biliaires (commerciaux). 2 gr. 50.

Gélose 15 grammes.

Neutraliser le milieu à la soude normale. Refroidir au-dessous de 60°, ajouter 2 blancs d'œuf battus en neige.

Porter à l'ébullition, dès que l'albumine est coagulée, filtrer.

Ajouter au filtrat ainsi obtenu chaud et clair :

Esculine 1 gramme.

Citrate de fer 1 gramme.

Titrer l'acidité à l'aide de la solution décinormale de soude, et amener le milieu à 0,6. Si l'acidité est trop faible ajouter du citrate de fer, si au contraire elle est trop élevée ajouter un alcali.

On obtient un milieu gris bleuâtre, on le répartit dans des tubes et on stérilise à l'autoclave à 105° pendant 20 minutes.

Nosensemencements sur gélose à l'esculine ont été faits à partir des cultures en eau peptonée, les étalements étant faits sur deux boîtes pour chaque échantillon.

Les boîtes ensemencées placées à l'étuve à + 37° donnent en 24 heures des colonies noirâtres, qui deviennent rapidement franchement noires, lorsque la réaction est positive. Lorsque la réaction est négative on ne note aucun changement de couleur du milieu. Nous avons obtenu quelquefois des colonies très légèrement brunâtres après 48 heures et plus d'étuve, nous avons considéré ces réactions comme négatives.

II. — Résultats

On trouvera dans les tableaux ci-dessous les résultats de nos recherches concernant :

1° les colibacilles d'origine humaine (matières fécales et urine), tableaux I et II ;

2° les colibacilles d'origine animale (matières fécales), tableau III ;

3° les colibacilles isolés des eaux contaminées, tableaux IV et V ;

4° les colibacilles isolés des matières fécales ayant servi à contaminer artificiellement des eaux naturelles exemptes de colibacilles, tableaux VI, VII, VIII, IX, X.

TABLEAU I
COLIBACILLES D'ORIGINE HUMAINE

	MATIÈRES FÉCALES									
	N ^{os} 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Réaction du Rouge de méthyle...	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Réaction de Voges Proskauer....	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Adonite	—	—	+	—	—	+	—	—	+	—
Recherche de l'indol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	—	—	—	+	—	+	+	+	—	—
Milieu à l'esculine	+(1)	+	+	+	+	+	+	+	—	+

(1) Le signe + indique que la colonie est noire.

TABLEAU II
COLIBACILLES D'ORIGINE HUMAINE

	URINE				
	N ^{os} 11	12	13	14	15
Réaction du Rouge de méthyle	+	+	+	+	+
Réaction de Voges Proskauer	—	—	—	—	—
Adonite	+	—	—	—	+
Recherche de l'indol	+	+	+	+	+
Saccharose	—	+	+	—	—
Milieu à l'esculine	+	+	—	+	+

TABLEAU III
COLIBACILLES D'ORIGINE ANIMALE

	MATIÈRES FÉCALES												
	Nos 16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
	cheval	cheval	cheval	cheval	cheval	chèvre	cheval	cheval	cheval	Lapin	cheval	cheval	cobaye
Réaction du Rou- ge de méthyle..	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Réaction de Voges													
Proskauer	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Adonite	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
Recherche de l'in- dol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	—	—	+	+	—	+	+	+	+	+	—
Milieu à l'esculine	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	+	—	+

TABLEAU IV
COLIBACILLES ISOLÉS DES EAUX CONTAMINÉES

	Nos 29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
Réaction du Rou- ge de méthyle..	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+
Réaction de Voges													
Proskauer	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
Adonite	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
Recherche de l'in- dol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	—	—	—	+	—	+	—	—	+	+	+	—
Milieu à l'esculine	+	+	—	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—

TABLEAU V
COLIBACILLES ISOLÉS DES EAUX CONTAMINÉES

	Nos 42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
Réaction du Rou- ge de méthyle..	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Réaction de Voges													
Proskauer	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Adonite	—	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
Recherche de l'in- dol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	—	—	—	+	+	—	—	—	—	+	+	—	—
Milieu à l'esculine	—	+	—	—	+	—	—	+	+	—	+	—	—

TABLEAU VI
COLIBACILLES ISOLÉS DES MATIÈRES FÉCALES
AYANT SERVI A CONTAMINER ARTIFICIELLEMENT UNE EAU NATURELLE
EXEMPTÉ DE COLIBACILLES
COLIBACILLE N° 1 (MATIÈRES FÉCALES HUMAINES)

	<i>Isolement</i>	Séjour dans l'eau : 5 jours	Séjour dans l'eau : 18 jours	Séjour dans l'eau : 22 jours
Réaction du Rouge de méthyle.	+	+	+	+
Réaction de Voges Proskauer...	—	—	—	—
Adonite	—	—	—	—
Recherche de l'indol	+	+	+	+
Saccharose	—	—	—	—
Milieu à l'esculine	+	—	—	—

TABLEAU VII
COLIBACILLE N° 3 (MATIÈRES FÉCALES HUMAINES)

	<i>Isolement</i>	Séjour dans l'eau : 5 jours	Séjour dans l'eau : 18 jours	Séjour dans l'eau : 22 jours
Réaction du Rouge de méthyle.	+	+	+	+
Réaction de Voges Proskauer...	—	—	—	—
Adonite	+	—	—	—
Recherche de l'indol	+	+	+	+
Saccharose	—	—	—	—
Milieu à l'esculine	+	+	+	+
		—	=	=

TABLEAU VIII
COLIBACILLE N° 4 (MATIÈRES FÉCALES HUMAINES)

	<i>Isolement</i>	Séjour dans l'eau : 5 jours	Séjour dans l'eau : 18 jours	Séjour dans l'eau : 22 jours
Réaction du Rouge de méthyle.	+	+	+	+
Réaction de Voges Proskauer...	—	—	—	—
Adonite	—	—	—	—
Recherche de l'indol	+	+	+	+
Saccharose	+	—	—	—
		+	+	+
Milieu à l'esculine	+	—	—	—
			=	=

TABLEAU IX

COLIBACILLE N° 24 (MATIÈRES FÉCALES DE CHEVAL)

	<i>Isolement</i>	Séjour dans l'eau : 5 jours	Séjour dans l'eau : 18 jours	Séjour dans l'eau : 22 jours
Réaction du Rouge de méthyle.	+	+	+	+
Réaction de Voges Proskauer...	—	—	—	—
Adonite	—	—	—	—
Recherche de l'indol	+	+	+	+
Saccharose	+	—	—	—
Milieu à l'esculine	+	+	+	+
		—	=	=

TABLEAU X

COLIBACILLE N° 26 (MATIÈRES FÉCALES DE CHEVAL)

	<i>Isolement</i>	Séjour dans l'eau : 5 jours	Séjour dans l'eau : 18 jours	Séjour dans l'eau : 22 jours
Réaction du Rouge de méthyle.	+	+	+	+
Réaction de Voges Proskauer...	—	—	—	—
Adonite	—	—	—	—
Recherche de l'indol	+	+	+	+
Saccharose	+	—	—	—
Milieu à l'esculine	+	+	+	+
		—	=	=

III. — Discussion des résultats

De l'examen des tableaux précédents, il résulte que certains caractères que nous avons étudiés ont une valeur réelle et même très grande au point de vue de la nature originelle des colibacilles trouvés.

La réaction du rouge de méthyle a été positive 28 fois sur 28 échantillons de colibacilles fraîchement émis, qu'il s'agisse d'espèces provenant de matières fécales humaines ou animales. La proportion a donc été de 100 %.

Dans les eaux, elle a été positive 24 fois sur 26 échantillons examinés, la proportion a donc été de 92,3 %. Dans les deux cas où elle a manqué, il s'agissait cependant, dans l'un, d'une eau renfermant plus de 5.000 colibacilles au litre, sans qu'on ait pu mettre en évidence d'autres signes de contamination (bactéries putrides, etc) ; dans le second cas, il s'agissait d'une eau d'égout.

Dans les cinq cas où des microbes fraîchement émis ont étéensemencés dans de l'eau naturelle exempte de colibacilles, ces microbes ont conservé l'aptitude à donner la réaction du rouge de méthyle au bout de 22 jours. Il est évident que ce laps de temps est insuffisant, mais nous reprendrons ces expériences sur un temps beaucoup plus prolongé.

La réaction de Voges Proskauer a été négative 28 fois sur 28 échantillons de colibacilles fraîchement émis (origine humaine et animale). La proportion a donc été de 100 %.

Dans les eaux, elle a été négative 24 fois sur 26 échantillons analysés. La proportion a été 92,3 %. Il est à noter que dans ces deux cas, les eaux, qui avaient donné une réaction négative avec le rouge de méthyle, ont eu une réaction de Voges Proskauer positive. Il semble donc exister une relation inverse entre ces deux réactions.

Dans les cinq cas où les eaux avaient été contaminées artificiellement, les colibacilles ont donné au bout de 22 jours une réaction négative non influencée par conséquent par leur séjour dans l'eau.

L'adonite n'a pas donné de fermentation 22 fois

sur 28 échantillons de colibacilles fraîchement émis, soit dans 78,5 % des cas.

Pour les eaux, les colibacilles isolés n'ont pas donné de fermentation 23 fois sur 26 échantillons, soit dans 88,4 % des cas.

Le court séjour dans l'eau des colibacilles fraîchement émis ne semble pas influencer beaucoup cette réaction. Dans un seul cas (tableau VII) la fermentation de l'adonite, qui avait été positive pour le colibacille n° 3, est devenue négative après un séjour de 5 jours dans l'eau et s'est maintenue négative pendant 22 jours.

La recherche de l'indol s'est montrée positive pour tous les colibacilles que nous avons isolés, qu'ils soient d'origine humaine, animale, ou isolés des eaux contaminées.

Les cinq échantillons de colibacilles avec lesquels nous avonsensemencé de l'eau naturelle, exempte de colibacilles, ont conservé l'aptitude à donner de l'indol au bout de 22 jours.

Les colibacilles isolés des matières fécales (humaines, animales) n'ont pas fait fermenter le *saccharose* 13 fois sur 28 échantillons, la réaction a donc été négative dans 46,42 %.

Pour les colibacilles isolés des eaux, 16 échantillons sur 26 n'ont pas fait fermenter le saccharose, soit dans la proportion de 61,53 %.

Après avoir séjourné dans l'eau 5 jours, 3 échantillons de colibacilles fraîchement émis, qui avaient fait fermenter le saccharose, se sont montrés sans action sur ce sucre.

Nous avons noté 13 fois *l'apparition de colonies noires sur gélose à l'esculine* avec les 28 échantillons de colibacilles fraîchement émis, soit dans 46,42 %.

Pour les eaux, 9 échantillons sur 26 ont donné cette réaction, soit dans 34,61 %.

Les 5 échantillons de colibacilles ayant servi à contaminer artificiellement des eaux naturelles avaient donné lors de leur isolement des matières fécales une réaction nettement positive ; nous avons noté dans les 5 cas, après un séjour de 5 jours dans l'eau, un affaiblissement de cette réaction, qui diminue encore après 18 jours, pour devenir à peu près négative au bout de 22 jours.

Il semble donc que l'apparition des colonies noires sur gélose à l'esculine soit en rapport avec l'origine récente des colibacilles, cette réaction étant d'autant plus nette qu'il s'est écoulé peu de temps entre leur émission et leur signalement dans l'eau analysée.

CHAPITRE V

Les bactéries putrides

Comme nous l'avons fait remarquer, la recherche exclusive du colibacille, l'obtention de réactions positives avec le bouillon au rouge neutre ne donnent pas une sécurité. Il est nécessaire d'y ajouter la recherche des bactéries dites « *putrides* ».

Nous avons rencontré ces bactéries dans les eaux, soit associées au colibacille, soit seules.

DIÉNERT et ETRILLARD (6) insistent d'ailleurs sur le fait que la longévité de ces germes dans l'eau est supérieure à celle du colibacille, ce qui expliquerait qu'on puisse les rencontrer sans trouver du colibacille. Ils seraient dans ce cas l'indice d'une contamination fécale déjà ancienne.

Pour d'autres auteurs, BONJEAN (3) en particulier, les fermentations putrides formées par ces bactéries empêcheraient le développement des cultures du colibacille en bouillon phéniqué. Nous avons en effet

remarqué que pour les échantillons d'eau renfermant à la fois des « *bactéries putrides* » et du colibacille, le nombre de colibacilles mis en évidence était toujours faible.

	Bactéries putrides	Nombre de colibacilles au litre
Eau n° 1	+	—
Eau n° 2	+	—
Eau n° 3	+	10
Eau n° 4	+	50
Eau n° 5	+	20

Les eaux sontensemencées suivant notre technique habituelle en bouillon phéniqué. Au bout de 48 heures les tubes qui ont poussé dégagent une odeur fécaloïde très caractéristique, due à la décomposition des matières albuminoïdes du bouillon. On note de plus un dégagement gazeux.

La recherche de l'indol est inconstante, presque toujours négative pour les échantillons que nous avons eus à examiner.

Après isolement des bactéries, leur ensemencement sur différents sucres (lactose, glucose, saccharose, mannite, maltose) montre leur forte aptitude fermentative, qui se manifeste en général au bout de 24 heures.

Le rouge neutre est réduit, le virage et la fluorescence sont constants.

La production d'hydrogène sulfuré, mise en évidence par ensemencement sur gélose au sous-acétate de plomb, est toujours positive, c'est-à-dire que l'on note l'apparition de « colonies noires ». Or, DIÉNIERT et ETRILLARD ont établi que l'apparition des « colo-

nies noires » indique qu'il s'agit de B. Eberth, paratyphique B, bacillus coli (colloïdes, anindolicum). Le B. coli communis donne des colonies faiblement teintées. Mais comme le font remarquer ces auteurs, « quand on poursuit l'identification de ces germes, il est extrêmement rare que, même s'il s'agit d'une eau polluée, on ait affaire à un des germes pathogènes du groupe. A défaut de ces germes, on se borne à signaler que l'eau examinée présente des germes producteurs d'hydrogène sulfuré, ou plus brièvement qu'elle contient des « colonies noires ».

Ces germes existent plus particulièrement dans les eaux superficielles, les eaux d'égout. Au point de vue indice de contamination fécale il semble qu'on doive leur accorder une certaine attention.

Nous avons isolé, à partir de 5 échantillons d'eau, des « bactéries putrides » et nous en avons mentionné les principaux caractères dans le tableau suivant :

	Bacille N° 1	Bacille N° 2	Bacille N° 3	Bacille N° 4	Bacille N° 5
Forme.....	Bacille mobile	Bacille diplobacille	Bacille	Diplobacille	Bacille mobile
Gram.....	négatif	négatif	positif	négatif	négatif
Gelose inclinée.....	culture feu, épaisse bleutée	culture envahissante grisâtre	culture vernissée	culture bleutée, sèche	culture blanchâtre
B. lactosé tournesolé..	+	+	+	+	+
B. glycosé tournesolé..	+	+	+	+	+
B. saccharosé tournesolé..	+	+	+	+	—
B. mannité tournesolé..	+	+	+	+	+
B. maltosé tournesolé..	+	+	+	+	+
B. adonité tournesolé..	+	—	—	+	—
Gélose au plomb.....	noircit	noircit	noircit	noircit	noircit
Gélose au rouge neutre	virage et fluorescence	virage et fluorescence	virage et fluorescence	virage et fluorescence	virage et fluorescence
Indol	—	—	—	—	—

Comme on peut le remarquer, ces bactéries ont des caractères communs constants : fermentation des glucose, lactose, mannite, maltose, virage du rouge neutre, noircissement du plomb et absence de production d'indol, mais différent par les autres caractères étudiés. Leur nombre n'est pas encore suffisant pour qu'on puisse en faire une classification, mais leur étude sera poursuivie. En tout cas, leur signification de contamination n'est pas douteuse et toutes les fois qu'on les découvrira dans l'eau, on devra considérer cette dernière comme contaminée.

Conclusions

L'étude des caractères donnés par la « *Standard methods of water analysis* », qui est suivie par les services publics d'hygiène des Etats-Unis, pour établir l'origine des colibacilles rencontrés dans l'eau, nous amène aux conclusions suivantes :

1° La recherche de l'indol s'est toujours montrée positive quand il s'est agi de colibacilles d'origine fécale récente.

2° Dans la majorité des cas la réaction de Voges Proskauer a été négative, comme l'indique la méthode américaine en pareil cas.

3° La réaction du rouge de méthyle s'est montrée positive dans presque tous les cas où il s'agissait également de colibacilles d'origine fécale.

4° La fermentation du saccharose s'est trouvée en défaut dans un grand nombre de cas.

5° Quant à la fermentation de l'adonite, la réaction est loin d'être fidèle.

6° En ce qui concerne la liquéfaction de la gélatine, elle ne peut entrer en ligne de compte comme carac-

tère d'origine, ce phénomène n'étant pas retenu en France parmi les caractères biochimiques servant à l'identification du colibacille. On en fait le caractère différentiel entre le colibacille et le *Bacillus cloacæ*.

7° La fermentation de l'esculine par les colibacilles fraîchement émis se perd très rapidement par le séjour de ces microbes dans l'eau, et le noircissement du milieu paraît de ce fait avoir une valeur de la plus haute importance.

Vu : LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE,
LE DOYEN, COURMONT.
JEAN LEPINE.

Vu et permis d'imprimer

LYON, le 24 Juin 1930.

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
GHEUSI.

Bibliographie

(Les chiffres placés en regard des noms des auteurs correspondent aux chiffres entre parenthèses placés dans le texte à la suite de ces mêmes noms.)

1. ACHARD et RENAULT. — Sur les différents types de B. urinaires appartenant au groupe du Bacterium Coli. *Société de Biologie*, 1892, p. 983.
2. BETTENCOURT et BORGES. — Colibacille et fixation du complément. *Arch. de l'Inst. bact. Camara Pestana*, Lisbonne, II, 1908, p. 245.
3. BONJEAN (E.). — *Le sol et l'eau*. Baillière, 1925, p. 289.
4. BORNAND. — Recherches sur l'isolement du B. coli dans les eaux par le procédé d'Eijkman. *Centralblatt*, n^{os} 21-25, 20 septembre 1913.
5. BRAUN. — Le rouge neutre et le diagnostic rapide de la souillure des eaux de boisson par le colibacille. *Bull. de l'Institut Pasteur*, IV, 1906.
6. DIENERT et ETRILLARD. — Etude sur les germes de l'eau producteurs d'hydrogène sulfuré. Identification de ces germes. *Annales des Services techniques d'Hygiène de la Ville de Paris*, t. VI, 1925, p. 198.
7. DIENERT et GUILLERD. — Milieu à l'eau de levure autolysée. *Compte rendu Académie des Sciences*, 27 janvier 1919, t. 168, p. 256.
8. DUCLAUX. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1893, p. 514.
- 8 bis. EIJKMAN. — Die gärungsprobe bei 46° als Hilfsmittel beider Trinkwasser Untersuchung. *Centralblatt für Bakt.*, 1904, t. XXXVII, fasc. 5, p. 742.

9. GILBERT et LION. — Contribution à l'étude des bactéries intestinales. *Sem. méd.*, 1893, p. 130.
10. GUILLERD (A.). — *Notions d'hydrologie appliquée à l'hygiène*. Paris, Béranger, éditeur, 1923, p. 26.
- Analyse bactériologique de l'eau. *Annales d'Hygiène publique, industrielle et sociale*, nouvelle série, t. V, novembre 1927, p. 645.
11. HARRISON et VAN DER LECK. — Aesculin Bile salt Media for water analysis. *Centr. f. Bakt.*, II, t. XXII, 1909, pp. 547-551.
12. LEMBKE. — Bacterium coli anindolicum und Bacterium coli anaerogenes. *Arch. für Hygiene*, 1896, p. 384.
13. LEVINE (Max). — The correlation of the Voges Proskauer and methyl-red reactions in the colon aerogenes group of bacteria. *Journ. of inf. dis.*, t. XVIII, avril 1916, p. 358.
- Differentiation of B. coli and B. aerogenes on a simplified eosin. Methylene blue agar. *Journ. of inf. Dis.*, t. XXIII, n° 1, juillet 1918, pp. 43-47.
- On the significance of the Voges Proskauer reaction. *Journ. of Bacteriology*, 1, 1916, 153.
- Bacteria fermenting lactose and their significance in water analysis (Iowa State College Official), B. 62, 1921.
14. LÖHNIS. — *Précis de bactériologie agricole*, traduit de l'allemand par H. Küfferath. Bruxelles, 1912, p. 86.
15. MACÉ. — *Traité de bactériologie*. Baillière, 1912, t. II, p. 222.
16. MAGALHAES (DE). — 1.290 souches de colibacilles de l'intestin de l'homme. *Compte rendu Soc. de Biologie*, 2 juin 1924, p. 234.
- Les colibacilles de quelques bovidés et équidés. *Compte rendu Soc. de Biologie*, 21 juillet 1926, p. 1262.
17. MANDOU (A.) et GRUAT (E.). — Contribution à l'étude bactériologique des eaux. Les bacilles coliformes. *Annales de l'Inst. Pasteur*, t. XXIX, 1915, p. 459.
18. MOLLIEUX (P.). — *Analyse bactériologique des eaux*. Le François, éditeur. Paris, 1925.

19. ROCHAIX (A.) et DUFOURT (A.). — Remarques sur la réaction du neutral-rot. *Compte rendu Soc. de Biologie*, 29 octobre 1910, t. LXIX, p. 312.
- Signification de la réaction du neutral-rot. Essai sur son mécanisme. *Compte rendu Soc. de Biologie*, 5 novembre 1910, t. LXIX, p. 326.
20. ROCHAIX (A.). — Présence des sucres (lactose, glycose, etc.) dans les bouillons au rouge neutre, destinés à la recherche rapide du colibacille dans les eaux de boisson. *Revue d'Hygiène*, t. XXXVI, février 1914, p. 143.
- Recherche rapide de la contamination bactériologique des eaux de boisson. *Revue d'Hygiène*, 1917, 89, p. 472.
- La détermination de l'origine fécale des colibacilles isolés des eaux d'alimentation. *Congrès de l'Avancement des Sciences*, Grenoble. 1925.
- Milieux à l'esculine et colibacilles. *Compte rendu Société de Biologie*, 19 novembre 1923, t. LXXXIX, p. 1042.
- Standardisation des méthodes d'analyse bactériologique des eaux. *Revue d'Hygiène*, décembre 1925, p. 1148.
- A propos de la signification de la présence du colibacille dans les eaux. Un exemple d'interprétation négative. *Congrès de l'Association française pour l'Avancement des Sciences*, La Rochelle, août 1928.
21. ROCHAIX (A.) et SARDA (H.). — Quelques caractères brochimiques du *Proteus* X¹⁹. *Compte rendu Société de Biologie*, 12 juillet 1926.
- Emploi des milieux à l'esculine pour le diagnostic différentiel des bactéries. *Revue d'Hygiène*, t. XLIX, n° 8, août 1927.
22. ROTHBERGER. — Differentialdiagnostische untersuchungen mit gefarbten Nährböden. *Centralblatt für Bakt.*, 1^{te} Abth. XXIV, 1893, p. 513, et XXV, 1899, pp. 15 et 69.

23. SAVAGE. — Neutral Red in the routine bacteriological examination of Water. *Journ. of Hyg.*, I, 1901, p. 437.
 24. SCHOBL (Otto) and RAMIREZ (José). — Of the Biological Laboratory. *The Philippine Journal of Sciences*, Manille, n° 3, juillet 1925.
 - 24 bis. *Standard Method of Water analysis*. Etats-Unis, 1923, p. 106.
 25. VINCENT (H.). — Sur le dosage du B. coli dans l'eau de boisson. *Hygiène générale et appliquée*, 1909, p. 74.
 26. VOLLE-DUSSURGET (M^{me}). — Contribution à l'étude des résurgences et de la signification du colibacille dans l'eau. *Thèse de Lyon*, 1926.
 27. WILLIAM (W.) BROWNE. — Predominance among the members of the Bacillus coli group in artificially stored water. *Journ. of inf. Dis.*, t. XVII, juillet 1915, p. 72.
 28. WILSON (W. J.). — Recent advances in the Bacteriological examination of Water. *J. State Med.*, London, 1922, 30, 437-443.
-

TABLE DES MATIÈRES

Avant-Propos	9
Introduction	11
<i>Chapitre Premier.</i> — Le colibacille, indice de contamination de l'eau potable	13
<i>Chapitre II.</i> — Origine du colibacille dans l'eau ..	21
<i>Chapitre III.</i> — Méthodes actuelles de détermination de l'origine du colibacille	25
<i>Chapitre IV.</i> — Recherches personnelles	43
<i>Chapitre V.</i> — Les bactéries putrides	57
Conclusions	61
Bibliographie	63



IMP. BOSC FRÈRES & RIOU

42, QUAI GAILLETON ,

LYON



